FACSCAN MODE D'EMPLOI

MISE EN ROUTE

- **Allumer le FACScan et l'imprimante** avant l'ordinateur
- Ouvrir devant, volet du bas :
  - Vérifier que la valve de pression est baissée
  - Vider la poubelle (réservoir de droite)(normalement c'est fait par l'utilisateur précédent) : décliper la sonde et les 2 tuyaux
  - Ajuster le niveau de liquide de veine au 2/3 (FACS Flow, réservoir de gauche) (idem, décliper les tuyaux pour soirtir le réservoir)
  - Remonter la valve (l'indication « Standby « doit s'afficher)

Remarque : les fils électriques sont sensibles, attention aux faux contacts, sinon l'appareil indique « Not Ready »

- Purger: le circuit
  - Fluid control sur Lo
  - Run
  - Valve sous pression
  - Purger le circuit en ôtant, au dessus d'un bécher, le bouton blanc du tuyau de purge , et le remettre ausitôt.

  La chambre d'analyse :
  - Dégager le support du tube, enlever le tube
  - Ouvrir le volet du haut
  - Faire Fill puis Drain plusieurs fois, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de bulles dans la chambre d'analyse
  - Remettre le tube d'eau

Acquisitions – utilisation du logiciel CellQuest Pro

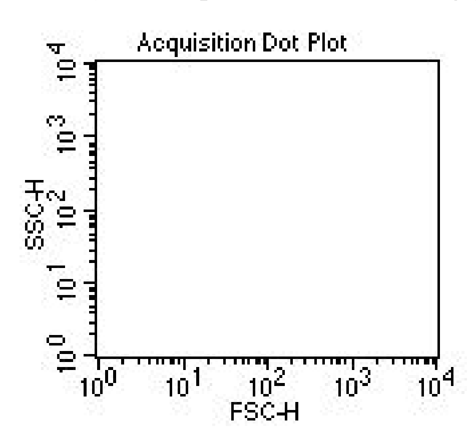
□ → Cell QuestPro

Un fichier "untitled" s'affiche, ainsi qu'une barre d'outils.
Lors de la première utilisation, ce fichier servira de page de travail pour les acquisitions.
File → setup → format A4 et 90% puis OK.

*(Sinon, il est possible de la retrouver en faisant **File → Open** et la retrouver dans son répertoire).*
Utiliser la barre d'outils pour créer les quadrants (dot plots ou histogrammes)nécessaires pour l'acquisition.
Une fenêtre "quadrant inspector" s'ouvre pour chaque quadrant,et permet de définir les paramètres souhaités en abscisse, ordonnée, nbre d'évènements représentés, couleur, …
Il faut, pour chacun :
- Plot type → acquisition to analysis
- show dots → 5000
- cocher multicolor dating.

1er quadrant

en X, choisir **FSC** (= Forward Scatter)(ou p1): *estimation de la taille*
en Y, choisir **SSC** (= Side Scatter)(ou p2) : *estimation de la granularité*
L'échelle doit être linéaire (ce n'est pas le cas sur cette figure).

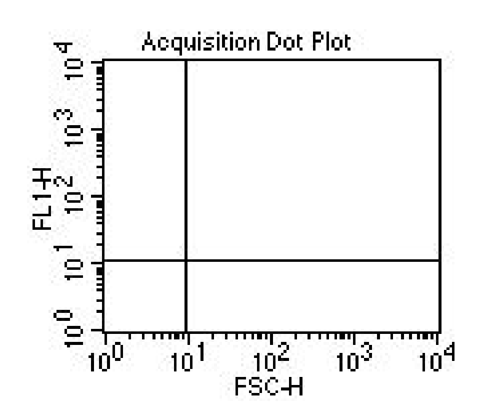


Ce quadrant permet d'ajuster les gains des photomultiplicateurs (PMT) de façon à visualiser une population cellulaire sous forme d'un nuage de points homogène.
Il sera possible de tracer une région d'intérêt autour de ce nuage de points, de façon à éliminer les agrégats ou débris, distincts de la population homogène, et que l'on ne souhaite pas analyser.

Pour mettre l'échelle en linéaire :
-Acquire → connect to cytometer
-Cytometer → Detectors/amps → mode : mettre FSC SSC en lin, les autres en log.

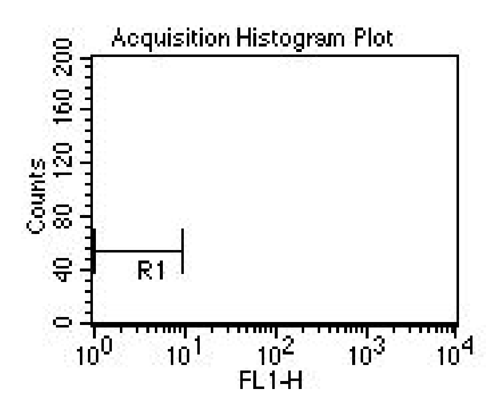
2ème quadrant

en X **: FSC, toujours en linéaire**
en Y : **FL1-H, en échelle Log**
FL1-H (ou p3) correspond au PMT associé au filtre de fluorescence dans le vert (voir schéma dans le classeur)
On verra donc un nuage de points selon les paramètres de fluorescence verte en fonction de la taille.
A l'aide de la barre d'outils, tracer une ligne au niveau de la valeur 10^1. Ceci permettra d'ajuster les gains des PMT de FL1 de façon à régler l'auto-fluorescence des cellules non marquées entre les valeurs 0 et 10^1.Lors de l'acquisition des cellules marquées, leur fluorescence apparaîtra au-delà de ce seuil.



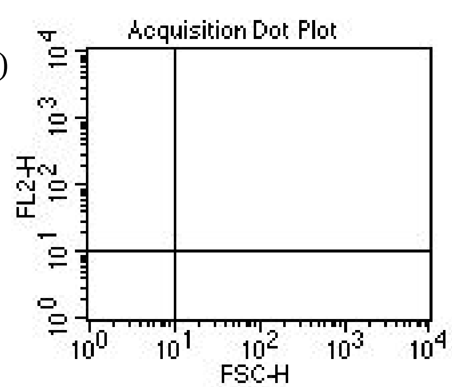
3ème quadrant : histogramme de la fluorescence verte

en X : FL1-H (en log)
en Y :donne le nbre d'évènements (counts)

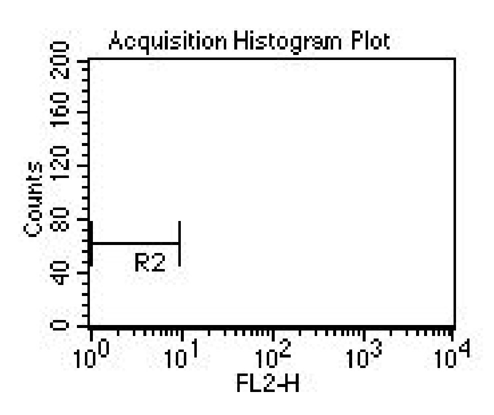


Le curseur R1 permet de repérer l'autofluorescence.

4ème quadrant :
refaire la même chose que le quadrant 2, mais avec FL2-H (rouge)



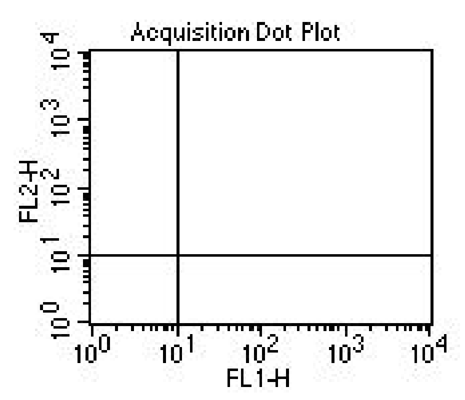
5ème quadrant : histogramme de la fluorescence rouge



6ème quadrant : fluorescence rouge en fonction de la fluorescence verte

en X : FL1-H
en Y : FL2-H
Permet de vérifier les bons réglages d'autofluorescence dans les 2 couleurs.

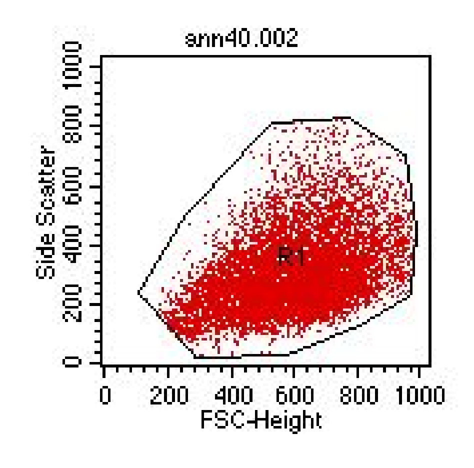
C'est à partir de ce quadrant que l'on pourra compenser FL2 par rapport à FL1 lorsque le vert "bave" dans le rouge.

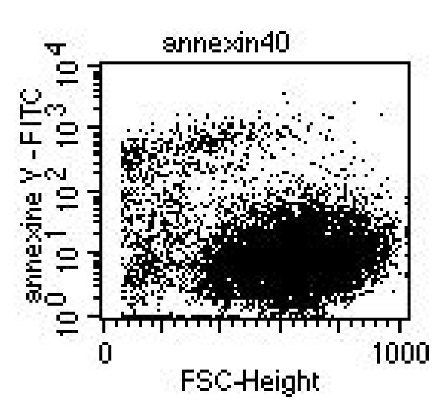


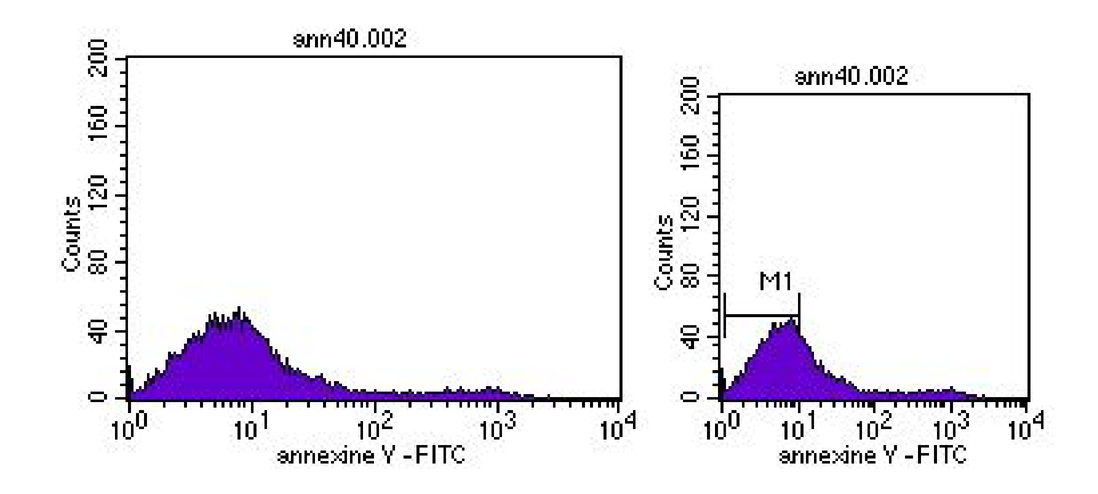
Pour chacun de ces quadrants, il est possible d'afficher des statistiques:
Sélectionner le quadrant, ou l'histogramme, puis dans la barre de menu, choisir **Stats → quadrant stats**,ou **Histogram stats**…
Les valeurs s'afficheront en direct au fur et à mesure de l'acquisition.
Dans **Stats → edit**…, on peut choisir plusieurs éléments :

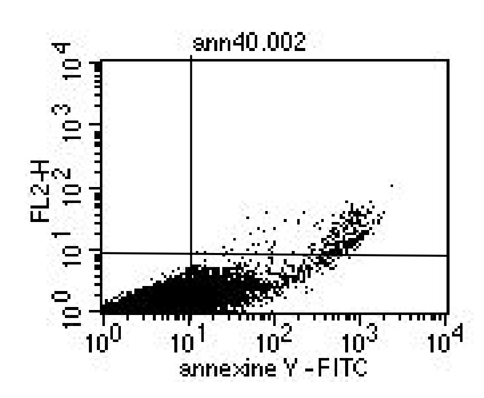
acquisition date	Gate
Quad label	sample ID
X parameters	File
Y parameters	
% Gated	
% Total	

Quand la feuille de travail est prête, elle peut être enregistrée. Lors d'une prochaine utilisation, elle pourra être rappelée par le menu **File →Open→settingsCécile** (par ex).
Exemple d'une page de travail (sans les stats) après une première acquisition (les réglages ne sont ici pas optimaux)









RÉGLAGES POUR L'ACQUISITION

- **Acquire → Connect to cytometer** (si cen'est pas déjà fait)

(si ce n'est pas possible, c'est que l'ordre d'allumage n'a pas été respecté : le cytomètre doit avoir été allumé avant l'ordi, sinon faire Restart)

- Acquire → acquistion&storage → 5000 ou 10 000
si on a définit une région d'intérêt, on peut définir l'acquisition sur R1(au lieu de "all", sélectionner "G1=R1")
- Acquire → counters
- Acquire → Parameter description
→ "Folder" : sélectionner ou créer le fichier correspondant à la manip (les acquisitions y seront enregistrées)(date par ex)

→ "File" : vérifier qu'on est sur "sample ID" et remettre le compteur à 1 ("file count)
puis **OK**
→ dans "sample ID" identifier le tube (ex : contrôle (1) J1 25/01)

- Cytometer → Detectors
- Cytometer → Threshold
- Cytometer → Compensation
- Cytometer → Status

Disposer chacune de ces fenêtres à droite de l'écran, à côté de la page de travail.

Ces fenêtres vont permettre d'effectuer les réglages préliminaires.
Lors d'utilisations ultérieures, il est possible de rappeler des réglages d'une précédente manip, et de se mettre ainsi dans des conditions expérimentales similaires :

- Cytometer → Instrument Settings → Open → fichier concerné puis "set" puis "done"

ETEINDRE LA LUMIÈRE

- Sur le FACS, mettre position "RUN" , Fluid Control sur "LO"
- Vortexer le tube de cellules non marquées, le placer sous la buse

- Sur l'ordi :

- dans la fenêtre "acquisition control", vérifier que le "setup" est coché

puis touche "acquire"

l'acquisition se fera en continu, jusqu'à ce que l'on clique sur "pause "ou "abort", il faut donc surveiller le niveau de suspension cellulaire dans le tube !

Lors de la "vraie" acquisition, on ne cochera plus le "setup" et l'acquisition s'arrêtera lorsque le nombre d'évènements définit aura été acquis **(5000 ou 10 000)**

si l'acquisition est normale, on commence à voir le nuage de points et l'histogramme;
dans "counters", si le nbre d'évènements analysés reste à 0 et qu'on ne voit pas les points, la buse est peut-être bouchée : stopper l'acquisition et faire "fill puis drain" plusieurs fois puis relancer l'acquisition.

Attention : vérifier que p1 (FSC) et p2 (SSC) soient en échelle linéaire, les autres en log.

RÉGLAGES DES DÉTECTEURS

Pour ajuster les réglages, on fera quelques acquisitions préalables :

1- cellules non marquées : pour ajuster l'autofluorescence

Dans la fenêtre "detectors/amp), ajuster les voltages (gains) des PMT pour p1 et p2 de façon à voir une population homogène en FSC/SSC.

2- cellules 100% marquées : pour suivre la fluorescence, et si besoin, ajuster les compensations entre les différents PMT. On aura donc autant de tubes 100% marqués que de fluorochromes à analyser.
Normalement, les cellules fluorescentes apparaissent au-dessus des valeurs 10^1 de l'autofluorescence, sans avoir à modifier les réglages.
Si ce n'est pas le cas, observer au microscope à fluorescence quelques cellules, pour vérifier la spécificité du marquage.

Ensuite, lorsque les réglages seront établis, on pourra passer les tubes des cellules en conditions expérimentales.

Conseil : faire des triplicates : 3 tubes différents pour chaque condition (3 contrôles, 3 traités, etc…)

PROCÉDURE D'EXTINCTION

Logiciel : « Acquire » puis « Disconnect from Cytometer »

Mettre du FACS Clean (2 ml) dans un tube
Run
Laisser pendant 10 à 20 minutes
Mettre un tube de FACS Rinse
Run
Laisser pendant 10 à 20 minutes
Mettre un tube d'eau distillée
Standby
Baisser la Valve
Vider la poubelle dans l'évier
Remettre 200 ml d'eau de javel diluée
Remettre en place
Eteindre l'ordinateur puis le FACS

Remarque : la buse (embout gris) ne doit jamais être immergée dans du liquide : ne pas trop remplir les tubes, mais veiller à ce que le système n'aspire pas de l'air (ne pas laisser aspirer la totalité du contenu du tube !!!